Aus dem Anatomischen Institut
der Universität Düsseldorf, II. Lehrstuhl
Direktor: Professor Dr. med. H. G. Goslar
und der Hautklinik der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. Dr. A. Greither

DIE PEPSINVORBEHANDLUNG MENSCHLICHEN SPERMAS ALS STANDARDMETHODE IN DER IMPULSZYTOPHOTOMETRISCHEN ANALYSE ZUR DIAGNOSTIK VON SPERMATOGENESESTÖRUNGEN

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Wolfgang Hartmann

1982

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538101_0061

Aus dem Anatomischen Institut der Universität
Düsseldorf, II. Lehrstuhl
Direktor: Professor Dr. med. H.G. Goslar

und der Hautklinik der Universität Düsseldorf
Direktor: Professor Dr. Dr. A. Greither

DIE PEPSINVORBEHANDLUNG MENSCHLICHEN SPERMAS ALS STANDARDMETHODE IN DER IMPULSZYTOPHOTOMETRISCHEN ANALYSE ZUR DIAGNOSTIK VON SPERMATOGENESESTÖRUNGEN

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin.
Der Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Wolfgang Hartmann

1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan	Referent
der Medizinischen Fakultät	gez.:
der Universität Düsseldorf	Prof. Dr. med. Goslar
	Korreferent
gez.:	gez.:
Prof. Dr. med. Arnold	Prof. Dr. med. Hofmann

Meinen lieben Eltern

Für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes in seinem Institut und für die kritische Durchsicht des Manuskriptes danke ich Herrn Professor Dr. med. H.G. Goslar.

Herrn Professor Dr. med. N. Hofmann danke ich für die hilfreiche Bereitstellung des Untersuchungsmaterials und für die bei der Abfassung und Durchsicht der Arbeit gegebenen kritischen klinischen Hinweise.

Für die Bereitstellung des Impulszytophotometers am Fraunhofer-Institut für Toxikologie und Aerosolforschung in Schmallenberg und für die methodisch-technische Hilfe danke ich Herrn Dr. rer. nat. F.J. Otto.

Herrn Privat-Dozenten Dr. rer. nat. H. Hettwer gilt mein besonderer Dank für die umsichtige Gesamtbetreuung der Arbeit und für die vielen Anregungen bei der Durchführung der Auswertung und der Zusammenstellung der Ergebnisse.

UNIV. LEIDEN BIBL.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG

1.1 Fluorometrische DNS-Messung

1.2 Spermatozoen-Fluorochromierung

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Fixierung und Aufbereitung

2.1.1 Testesbiopsien

2.1.2 Sperma

2.1.3 Chromatindekondensierung

2.1.3.1 Mit Pepsin

2.1.3.2 Mit Papain

2.2 Ausstattung des Impulszytophotometers

3. ERGEBNISSE

3.1 Pepsin- und Papainvorbehandlung am

3.1.1 Testesgewebe

3.1.2 Sperma

3.2 Klinische Anwendung der Pepsinbehandlung

3.3 Abbildungen

4. DISKUSSION

5. ZUSAMMENFASSUNG

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

1.1 Fluorometrische DNS-Messung

Die Messung des DNS-Gehaltes menschlicher Spermatozoen ist in der Andrologie für die Beurteilung männlicher Sub- bzw. Infertilität und Mutagenese von besonderer Bedeutung (LEUCHTENBERGER et al. 1953; MEYHÖFER 1963; STOLLA et al. 1978). Da jedoch bis heute keine ausreichend präzisen Methoden für solche Messungen zur Verfügung standen [1], stützte sich die Beurteilung der Fertilität auf wenige - durch geringe Meßgeschwindigkeit bedingte - zeitaufwendige und daher nicht genügend repräsentative Einzelanalysen (mit hoher Variationsbreite der Meßwerte; LEUCHTENBERGER et al. 1953; MEYHÖFER 1963). Deshalb lag der Gedanke nahe, die in den letzten Jahren entwickelten schnellen und hochauflösenden durchflußzytophotometrischen Methoden (DILLA et al. 1969; DITTRICH et al. 1969; KAMENTSKY et al. 1969; SPRENGER et al. 1971), als automatisierte Verfahren zum Nachweis geringster DNS-Mengen (10^{-13} g/Zelle), für die routinemäßige DNS-Bestimmung in die Klinik einzuführen (GÖHDE et al.

---

[1] So sind z.B. die absorptionszytophotometrischen und mikrofluorometrischen DNS-Messungen nach "klassischer" Feulgenreaktion vom Hydrolyseverhalten der Zellkerne abhängig.

1979; OTTO et al. 1979).

Bei der impulszytophotometrischen (icp-) Messung von Spermien ergaben sich jedoch in mehrfacher Hinsicht Schwierigkeiten. Zunächst waren technische Probleme wie Meßungenauigkeiten bzw. Meßschwankungen, die aus der oval abgeflachten, asymmetrischen Form der menschlichen Spermatozoen entstanden, zu lösen (DEAN et al. 1978; GLEDHILL et al. 1976; PINKEL et al. 1979). Dies wurde durch die spezielle Form der Durchflußkammer des Impulszytophotometers (ICP) erreicht; diese sorgt dafür, daß die Spermiensuspension in einer wirbelfreien Strömung parallel zur optischen Achse fließt. Durch hydrodynamische Orientierung in die Fokusebene des Instrumentes wird eine optimale Verminderung der optisch-geometrischen Einflüsse erzielt. Da das ICP in seiner Bauweise einem Auflichtfluoreszenzmikroskop vergleichbar ist, erlaubt der zusätzliche Einsatz von Immersionsobjektiven hoher numerischer Apertur die Erfassung großer Raumwinkel und macht so die Messung von Partikeln weitgehend unabhängig von ihrer Form (GÖHDE et al. 1979; OTTO et al. 1978; OTTO et al. 1979; ZANTE et al. 1977).

Eine weitere Schwierigkeit lag in der präparativen Technik. Da die in den Histogrammen photometrisch erreichbare Auflösung nicht nur vom DNS-Gehalt der Zellen und von der Meßgenauigkeit des ICP, sondern zu einem entscheidenden Teil auch von der Färbung und Präparation abhängt, führte dieses photometrische Verfah-

ren bei unterschiedlichen Präparations- und Färbetechniken zu hoher Streuung und schlechter Reproduzierbarkeit der Meßergebnisse.

1.2 Spermatozoen-Fluorochromierung

Neuerdings erwies sich zur Fluorochromierung menschlicher Spermatozoen der DNS-spezifische Farbstoff 4,6-Diamidino-2-Phenylindol (DAPI, 10 µM), (GÖHDE et al. 1978), von Vorteil gegenüber den bisher häufig verwandten Ethidiumbromid und Mithramycin (BARLOGIE et al. 1976; SEVERIN 1975; ZANTE et al. 1976). Bemerkenswerte Eigenschaften des DAPI stellen unter anderen seine besondere Affinität zu Adenin-Thymidinreicher DNS, seine Stabilität, Verwendbarkeit in geringen Mengen und Anfärbbarkeit in wenigen Minuten dar (KADEN et al. 1978). Infolge der extremen Kondensation des Spermienchromatins wird jedoch eine quantitative Bindung des genannten Fluoreszenzfarbstoffes weitgehend verhindert, weil die Interkalationsorte durch Chromosomenspiralisierung dem Farbstoff nicht zugänglich sind. Deshalb wandten wir uns den verschiedenen Möglichkeiten zur Dekondensation des Spermienchromatins zu und modifizierten - in Weiterführung der Arbeiten "Flow Cytometry of Human Spermatozoa" (OTTO et al. 1979 a, b) und "Desintegration des menschlichen Spermas bei der impulszytophotometrischen Analyse" (HOFMANN et al. 1980 a, b; FREUNDL et al. 1981; HETTWER et al. 1981) - eine der dort geprüften Methoden so, daß sie als Standardmethode

für die Spermaanalyse in der Klinik Anwerdung finden kann.

Die Suche nach einer neuen, bzw. verbesserten Methode wurde auch deshalb notwendig, weil die von den oben aufgeführten Autoren häufig verwandte Papainproteolyse der Spermien zu (Meß-) Ergebnissen führen konnte, die nicht im Einklang mit den, in der Klinik erstellten zytomorphologischen Spermaanalysen standen. Auf ZANTE et al.(1977) verweisend, verwandten wir als proteolytisches Enzym ebenfalls Pepsin, paßten aber die für Nager beschriebene Methode der von uns gewählten Essigsäure-Fixierung und DAPI-Fluorochromierung an.

Bei Auswertung von mehreren hundert Spermaproben nach Pepsinproteolyse erwies sich die anschließende Fluorochromierung der Spermatozoen-DNS als differenzierter, sodaß diese Methode im Nachfolgenden an einigen ausgewählten Beispielen vorgestellt werden soll(vgl. HARTMANN et al. 1982).

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Aufbereitung und Fixierung des Untersuchungsgutes

2.1.1 Testesbiopsien

Das Testesmaterial (von 14 Wochen alten Wistarratten mit einem Körpergewicht von ca. 280 g) wurde in 10 ml physiologischer NaCl-/Ringerlösung 1:1 bei Raumtemperatur homogenisiert. Nach Zentrifugation und Waschung in gepufferter, Ca- und Mg- freier EDTA-Lösung (RABINOWITZ 1964), erfolgte die Fixierung der Hodenzellsuspension in 10 %-iger Essigsäure. Für die ICP-Messungen wurden die fixierten Zellen bis zu 7 Tagen im Kühlschrank bei $4^{o}C$ aufbewahrt.

Das Testesmaterial vom Menschen entstammte einem 31-jährigen Patienten mit schwerer Spermatogenesestörung aus der Düsseldorfer Fertilitätssprechstunde. Das entnommene (Biopsie-)Gewebe wurde zerkleinert, durchgesiebt und in EDTA-Lösung (RABINOWITZ 1964) gewaschen. Nach Zentrifugation bei 800 Upm für 10 min wurde der Überstand abpipettiert, in NaCl-/Ringerlösung 1:1 resuspendiert, in 10 %-iger Essigsäure fixiert und ebenfalls bis zur weiteren Aufarbeitung im Kühlschrank aufbewahrt.

2.1.2 Sperma

Zur Untersuchung gelangte Sperma von Patienten der Fertilitätssprechstunde. Die spermatologische Klassi-

fizierung wurde nach der üblichen Methode vorgenommen, wobei in der Beurteilung der Spermatozoenmorphologie auf FREUNDL und HOFMANN (1980; 1980 a) verwiesen wird. In einzelnen Fällen wurden weiterführende Untersuchungen (z.B. radioimmunologische Bestimmung von LH, FSH, Prolaktin und Plasmatestosteron, sowie zur Diagnosesicherung Testesbiopsien) durchgeführt.
Da bei dem gegenwärtigen Stand des Wissens eine Nosologie der Spermatogenesestörungen noch nicht möglich ist, erfolgte eine Zuordnung der klinischen und spermatologischen Befunde zu Syndromen der Spermatogeneseschäden und Spermatozoenausreifungsstörungen (HOFMANN 1979).
Die Aufbereitung des Spermas für die zytophotometrische Messung erfolgte 2 bis maximal 4 Stunden nach der Gewinnung durch Masturbation. Zu diesem Zeitpunkt war die Verflüssigung der Spermaproben mit Sicherheit abgelaufen. 1 ml des Ejakulates wurden mit 19 ml 10 % - iger Essigsäure fixiert. Die so vorbereiteten Proben wurden im Fixierungsmittel bis höchstens 7 Tage im Kühlschrank bei 4° C aufbewahrt.

2.1.3 Chromatindekondensierung

2.1.3.1 Mit Pepsin

2 ml der fixierten Zellsuspension wurden mit 8 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7.5) für 10 min bei 2000 Upm zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden

zum Sediment 2 ml Pepsin (650 Anson-Einheiten / ml Pepsin in HCl, pH 1.8) gegeben. Nach Ablauf der gewählten Einwirkungszeiten von 10, 20, 30, 40, 60 oder 120 min wurde der Zellsuspension erneut 8 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7.5) zugefügt und sofort für 10 min bei 2000 Upm nochmals zentrifugiert. Anschließende Fluorochromierung erfolgte in 5 ml Tris-HCl-Puffer (pH 7.5) mit 10 µM 4,6-Diamidino-2- Phenylindol (DAPI) für mindestens 15 min .

2.1.3.2 Mit Papain

2 ml der fixierten Zellsuspension wurden 8 ml Tris-HCl-Puffer (pH 7.5) zugesetzt, für 10 min bei 2000 Upm zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und die Zellen in 0,1 n Natrium-Acetat-Essigsäurepuffer (pH 5.5), der 300 Anson-Einheiten / ml Papain, 20 mM Dithioerythrit (DTE) und 1 % -iges Dimethylsulfoxid (DMSO) enthielt, resuspendiert und für 5, 10, 15 oder 20 min inkubiert. Abermalige Zentrifugation (2000 Upm, 10 min) mit nachfolgender Resuspendierung und mindestens 15-minütiger Färbung in 5 ml DAPI 10 µM.

2.2 Ausstattung des Impulszytophotometers

Die Messung der zellulären Fluoreszenz mit den beiden so gewonnenen Suspensionen wurde mit einem Impulszytophotometer ICP 22 (Ortho Instruments, Westwood) durchgeführt. Für die Anregung der DAPI-gefärbten Zellen wurde ein UG 1 als Anregungsfilter und ein FT 420 als

chromatischer Strahlenteiler, für die Messung der Fluoreszenz ein GG 435 als Sperrfilter benutzt. Die Fluoreszenzlichtsignale wurden von einem Photomultiplier in elektrische Signale umgewandelt, verstärkt und einem Vielkanalanalysator zur Weiterverarbeitung zugeführt. Die in den einzelnen Kanälen gemessene Zellzahl wurde über einen Plotter als Histogramm dargestellt und auf Lochstreifen (Ascii Code) zur weiteren Aufbereitung gespeichert. Mit Hilfe eines Computerprogrammes wurden die meisten Kurven durch ein Exponentialfunktions-Anpassungsverfahren bereinigt. Dies war nötig, um zum einen das geräteabhängige Grundrauschen und zum anderen den statistisch streuenden Zellschutt optimal zu entfernen. Ebenfalls mit einem Computerprogramm konnten die einzelnen Zell-Maximalwerte innerhalb verschiedener DNS-Intervalle jeweils in einem bestimmten Kanal festgelegt werden.
Der Variationskoeffizient (CV) wurde in dieser Arbeit nach folgender Formel berechnet:

$$CV = \frac{\text{Halbwertsbreite} \times K}{X} = \quad (\%)$$

Halbwertsbreite: Breite des Peaks bei halber Höhe (mm)
Konstante K : 42,6
X : Abstand auf der Abzisse vom Nullpunkt bis zur Peakmitte (mm)
Das Ergebnis wird in Prozent angegeben.

3. ERGEBNISSE

3.1 Pepsin- und Papainvorbehandlung an

3.1.1 Testesgewebe

Bei der enzymatischen Vorbehandlung der Testesgewebe von Ratte und Mensch mit Papain zeigt sich im Histogramm bei allen von uns geprüften Einwirkungszeiten lediglich ein weit links auf der Abzisse gelegener Peak, der Zelltrümmern entspricht, sowie eine Erhöhung des Untergrundes (Abb. 1c; 2c). Demgegenüber kommen nach Pepsinvorbehandlung des gleichen Materials (Abb. 1b; 2b) mehrere deutlich voneinander getrennte, z.T. hohe steile Peaks zur Darstellung. Die 30-minütige Einwirkungszeit von Pepsin erweist sich hier als optimal, bei 10-minütiger Pepsinandauung entstehen hingegen unvollkommene Histogramme (Abb. 1a; 2a).

3.1.2 Sperma

Die Bedeutung der Pepsineinwirkungsdauer auf die Spermaprobe eines fertilen Patienten (721) mit leichter Asthenozoospermie zeigen die Histogramme der Abbildung 3a-d (3a:10min, 3b:20min, 3c:30min und 3d:40min Pepsineinwirkung); es wird jeweils ein hoher, schmaler Peak reifer haploider Spermatozoen abgebildet, dem nach rechts mehrere kleine Peaks folgen. Die Kurven der Abbildung 3 unterscheiden sich dennoch untereinander hinsichtlich ihrer Höhe, Steilheit

ihrer Flanken, Breite der Basis und Höhe des Untergrundes, und damit auch hinsichtlich ihrer, aus den obigen Kurvencharakteristika errechneten Variationskoeffizienten (CV). Das beste Ergebnis stellt sich, wie auch beim Testesgewebe, bei 30-minütiger Pepsineinwirkung im kleinsten CV dar (Abb. 3c). Die vergleichende Anwendung beider Enzyme auf Spermaproben mit klinisch diagnostizierter Normozoospermie oder auf solche mit vorausgegangenen (minimalen) Ausreifungsstörungen zeigt jedoch, daß beide Methoden in den Histogrammen (Abb. 4a, b) schmale hohe Peaks im haploiden DNS-Bereich mit geringer Varianz erzielen, wobei nach 15-minütiger Papainproteolyse der Spermatozoen der "haploide" DNS-Peak (Abb. 4a) auf der Abzisse immer rechts vom gleichen Peak nach Pepsinierung (Abb. 4b) abgebildet wird und meist den kleineren CV erbringt. In einigen Fällen mit leichten bis mittelgradigen Störungen der Spermatozoenmotilität und -morphologie werden jedoch nach Papainvorbehandlung lediglich abgeflachte Peaks mit breitem Untergrund und Linksverschiebung dargestellt (Abb. 5a; 6a), nach Pepsinandauung hingegen entstehen steile hohe Gipfel im haploiden DNS-Bereich (Abb. 5b; 6b).

Nachdem die Differenzen beider Vorbehandlungsmethoden an Einzelfällen mit Normozoospermie oder an leichten spermatologischen Veränderungen aufgezeigt worden sind, sollen nun an tiefgreifenden Störungen, wie z.B. Spermiogenese- und Spermiohistogenese-Störungen,

die mit pathologischer Spermatozoen-Morphologie, -Motilität und -Zahl einhergehen, die Anwendungsvorteile von Pepsin gegenüber Papain nochmals herausgestellt werden.

In einem ersten Fall, bei der Spermaprobe eines Patienten (278) mit zwar klinisch diagnostizierter Teratozoospermie, aber nur leicht ausgeprägten pathologischen Spermatozoenveränderungen (wie Mittelstück- und Schwanzveränderungen, Stauchformen, Formen mit symmetrischen Elongationen des postäquatorialen Segmentes) zeigt die Pepsinvorbehandlung (Abb. 7b) einen deutlich höheren Peak als mit der Papainmethode (Abb. 7a) zu erreichen war. So wird im Histogramm der Abbildung 7b neben einem Zelldebris-Peak, ein hoher, breitbasiger (1C-) Peak mit Rechtsschenkel zur Darstellung gebracht; rechts neben diesem findet sich noch ein kleinerer Peak, der jedoch auch dem haploiden DNS-Bereich zugeordnet werden muß (vgl. Abb. 9). Im Diploid-Bereich stellt sich ein niedriger, bandförmiger Untergrund dar. Im Histogramm der Abbildung 7a kommt dagegen ein breitbasiger überhöhter Zelldebris-Peak, ein höherer Diploid-Peak und ein nur relativ niedriger 1C-Peak zur Darstellung.
Bei einem Patienten (324), ebenfalls mit Teratozoospermie, nun aber mit hochpathologischen Spermatozoenformen (wie amorphe Kopfkonfigurationen, apikal zugespitzte hochkolorierte Formen und Rundformen), werden mit beiden enzymatischen Vorbehandlungen deutliche,

hohe und schmalbasige Peaks im haploiden DNS-Bereich erhalten (Abb. 8a, b). Der bei Papainvorbehandlung (Abb. 8a) abgebildete diploide Peak ist auch in diesem Falle erhöht und läßt sich somit den spermatologisch-andrologischen Befunden nicht ohne Weiteres zuordnen.

Auf das bessere Differenzierungsvermögen der Pepsinvorbehandlung sowohl im Haploid-, als auch im Diploidbereich, und auf die daraus folgende Zuordnung der einzelnen Peaks zu bestimmten Zelltypen soll an Hand des bereits erwähnten Patienten (721) noch einmal ausführlich eingegangen werden (Abb. 9): Der hohe schmale Peak reifer Spermatozoen wird in diesem Beispiel in Kanal 30 abgebildet. Der in Kanal 59 erscheinende kleinere Peak dürfte dann den doppelten DNS-Gehalt des Peaks in Kanal 30 ergeben. Ein weiterer, aber in diesem Falle recht kleiner Peak, stellt sich in Kanal 96 dar und liegt nach Vergleich mit einem Leukozytenstandard in dessen (DNS-) Abbildungsbereich. Somit muß der in Kanal 48 abgebildete Peak wiederum Zellen entsprechen, die in ihrem Kern einen haploiden DNS-Gehalt besitzen.

Als Interpretation der in Ejakulaten auch enthaltenen anderen Spermatogenesezellen ergibt sich nach dem vorher Gesagten: Der Peak mit seinem Maximum in Kanal 30 enthält reife haploide Spermatozoen. Der zweite, im Normalfall sehr kleine Peak mit seinem Maximum in Kanal 48, muß auch dem haploiden DNS-Bereich zugerechnet werden. Er repräsentiert entweder die in ihrer

Chromatinkondensierung zurückgebliebenen, noch nicht ausgereiften Spermatozoen oder die vorzeitig abgelösten, späten elongierten Spermatiden. Das in diesem Beispiel ebenfalls kleinere Maximum in Kanal 59 muß nun dem diploiden DNS-Bereich zugerechnet werden. Es kann sich hierbei um diploide Spermatozoen oder um sogenannte Zweierformen handeln. Letztere werden häufig im Sperma gefunden und stellen zwei fest miteinander verbundene, jedoch als Zellen getrennte Spermatozoen dar. Sie können zytomorphologisch mit den echten bicephalen Spermatozoen oder solchen mit großen Spermatozoenköpfen verwechselt werden. Demgegenüber dürfte der Peak, mit seinem Maximum in Kanal 96, intakten Leukozyten entsprechen. Andere diploide Zellen, wie Epithel-, Leydig-, Sertolizellen oder noch diploide Spermatogenesezellen kommen im Histogramm ebenfalls an dieser Stelle zur Abbildung.
Die Lage der Peaks im Haploid-Bereich mit ihrem jeweils entsprechenden DNS-Gehalt, wurde an humanen Nebenhoden-Spermatozoen überprüft. Zusätzlich wurden Spermaproben getestet, die überwiegend Spermatiden und Spermiozyten enthielten.

3.2 Klinische Anwerdung der Pepsinbehandlung

Nachdem sich die Pepsinvorbehandlung gegenüber der Papainproteolyse in Bezug auf differenzielle Darstellung, Reproduzierbarkeit und Übereinstimmung mit spermato-

logischen Befunden als vorteilhaft erwiesen hat, soll diese Methode an einigen - in der Klinik häufiger auftretenden - Krankheitsbildern getestet werden. Das erste Anwendungsbeispiel soll an drei unterschiedlich schwer ausgeprägten Varikozelen-Orchipathien das Differenzierungsvermögen dieser erarbeiteten Methode demonstrieren: Im Falle des Patienten 735 (Abb. 10a) liegt eine Varikozelen-Orchipathie ersten Grades mit linksseitiger Schädigung und retrotestikulärem Blut-Reflux vor. Die Diagnose wurde zusätzlich durch Dopplerultrasonographie und Phlebographie gesichert. Die zytologische Spermaanalyse ergab eine normale Spermienzahl mit Störungen im postäquatorialen Segment, einige Mittelstück- und Schwanzdeformierungen, sowie einen höheren Prozentsatz an exfoliierten Spermatiden. Das Histogramm (Abb. 10a) zeigt dementsprechend einen hohen steilen Peak im haploiden DNS-Bereich mit linksseitigem niedrigen Untergrund und rechtsseitig einen zusätzlichen kleineren Peak. Der zweite Fall (Patient 736; Abb. 10b) ist durch einen über lange Zeit nachgemessenen retrotestikulären Blut-Reflux mit linksseitiger Varikozele II. Grades charakterisiert. Die exfoliative Spermatogenesestörung war von größerem Ausmaß und zeichnete sich durch eine niedrigere Spermienzahl mit reduzierter Motilität der Spermien aus, ihre Morphologie zeigt leichtere bis schwere Störungen des postäquatorialen Segmentes sowie amorphe Formen. Das

Histogramm (Abb. 10b) weist einen mittelhohen Peak mit linksseitig plateauartig erhöhtem Untergrund auf. Das letzte Beispiel in dieser Reihe (Patient 724; Abb. 10c) zeigt eine Varikozele, die klinisch als "burned-out-varicocele" bezeichnet wird. Nach klinischer Untersuchung ergab sich linksseitig eine Varikozele II.-III. Grades, auf der rechten Seite eine Varikozele I.-II. Grades. Auf der linken Seite fand sich ein verkleinerter Hoden mit verminderter Blutzufuhr. Die Biopsie ergab eine Einengung des Lumens der Arteriolen, oft auch mit ihrem kompletten Verschluß. Die spermatologische Analyse erbrachte eine Oligozoospermie mit vielen unreifen Spermatogenesezellen, wie Spermatiden und Spermiozyten. Das Histogramm (Abb. 10c) zeigt erwartungsgemäß einen ausgesprochen niedrigen Peak reifer haploider Spermatozoen, rechts mit Übergang in einen kleinen Peak unreifer haploider Spermatozoen und links mit Übergang in einen höheren Zelldebris-Peak.

Insgesamt läßt sich das bessere Differenzierungsvermögen, das mit der Pepsinvorbehandlung sowohl im haploiden, wie auch im diploiden DNS-Bereich erreicht werden kann, an den Spermaproben eines Patienten (609; Abb. 11a-c; a: bei Behandlungsbeginn, b: nach antiphlogistischer Behandlung, c: nach niedrig dosierter antioestrogen-Medikation) aufzeigen, dessen Spermatogeneseschaden durch zusätzliche Testesbiopsie (vgl. Abb. 2) abgeklärt worden war. Es handelt sich um einen

entzündlich bedingten Testesschaden mit deutlich reduzierter, und qualitativ durch Exfoliation und Abbruch gestörter Spermatogenese. Das Ausgangshistogramm (Abb. 11a) zeigt einen mittelhohen, schmalen Peak im haploiden DNS-Bereich, der jedoch nach rechts verschoben ist, d.h. in den Bereich, der durch den Peak in Kanal 48 der Abbildung 9 repräsentiert wird. Nach Durchführung einer Biopsie und nach Entzündungsbehandlung verschiebt sich der Haploid-Peak (etwas) nach links; vermehrt kommt es zur Zelldebris-Bildung (Abb. 11b). Im weiteren Verlauf der Behandlung des Patienten mit Clomiphencitrat in niedriger Dosierung kommt in der Reboundphase der Peak reifer und haploider Spermatozoen an der entsprechenden (regelrechten) Stelle zur Abbildung (Abb. 11c). Sehr deutlich wird nun der erste diploide Peak dargestellt, d.h. der diploider Spermatozoen und Zweierformen, während sich der zweite diploide Peak mit Untergrund, äußerst rechts an entsprechender Stelle der Abzisse zeigt. Diese Ergebnisse stimmen mit den spermatologischen Befunden überein; es findet sich nach abgeschlossener Behandlung eine zwar noch verminderte, jedoch qualitativ vollwertige, in der Motilität und Morphologie ungestörte Spermatozoen-Population.

A B B I L D U N G E N

Abb. 1: Histogramme von Testesgewebe der Ratte nach Proteolyse mit a) 10 min Pepsin, b) 30 min Pepsin und c) 15 min Papain.

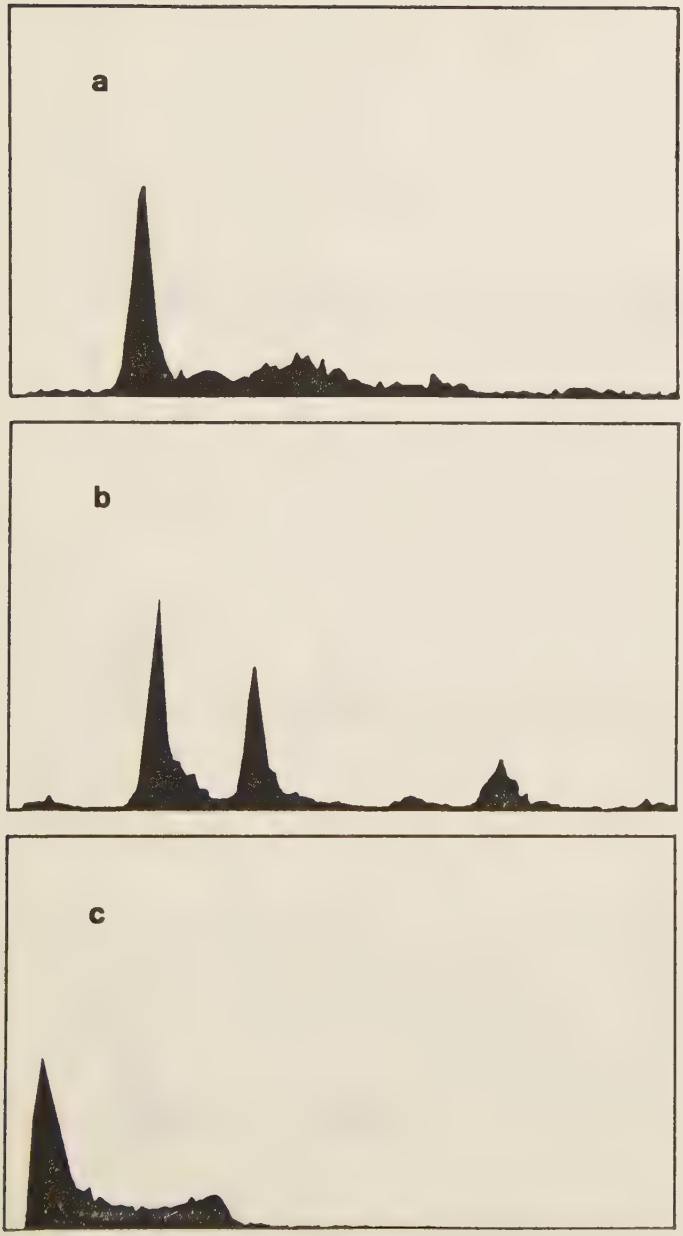

a
b
c

Abb. 2: Histogramme von menschlichem Testisgewebe (Patient 609) bei schwerem Spermiogeneseschaden (vgl. Abb. 11) nach Proteolyse mit a) 10 min Pepsin, b) 30 min Pepsin und c) 15 min Papain.

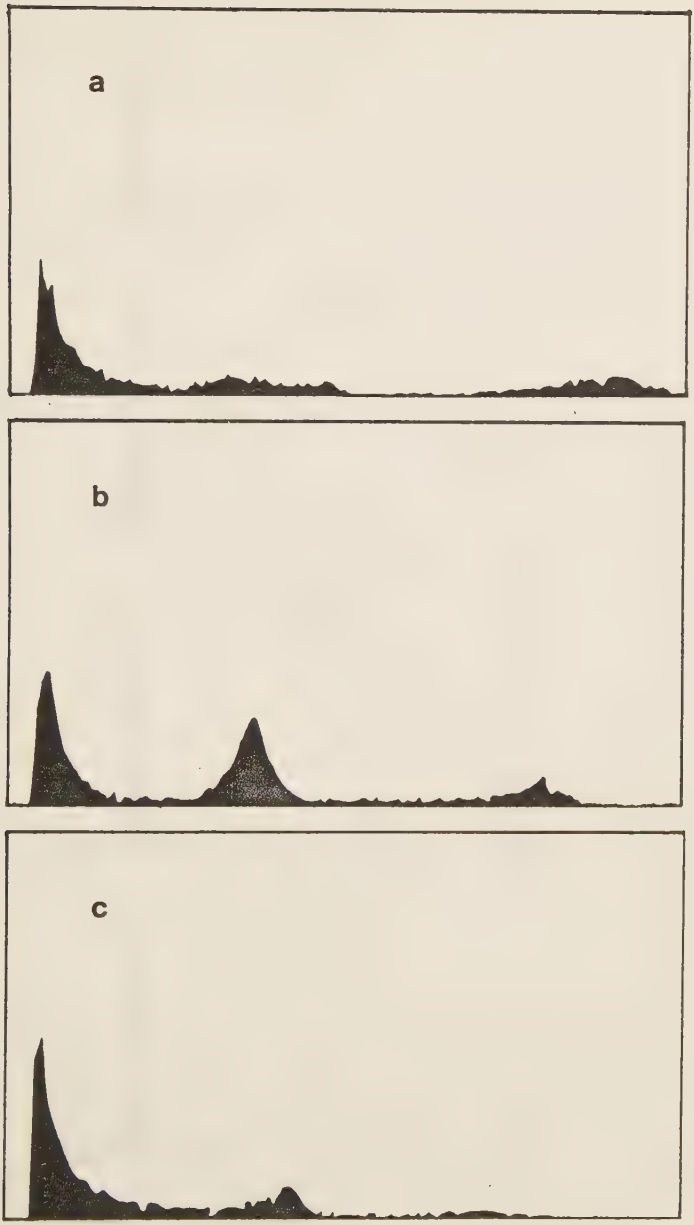
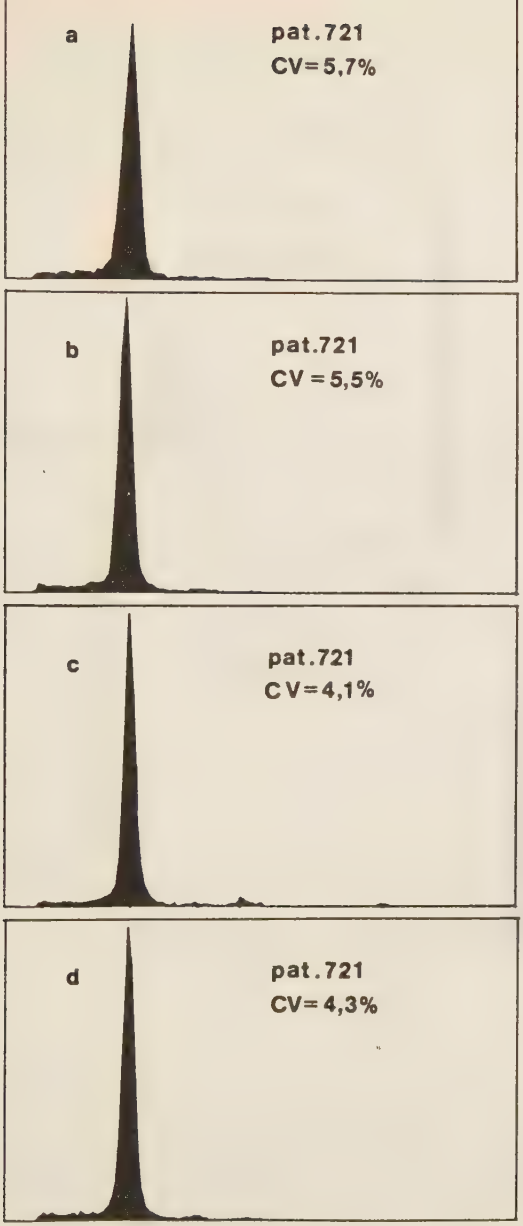

a
b
c

Abb. 3: Histogramme von Spermazellen (Patient 721) bei leichter Asthenozoospermie nach verschiedenen Einwirkungszeiten von Pepsin: a) 10 min, b) 20 min, c) 30 min und d) 40 min; (vgl. Abb. 9).


a
pat.721
CV=5,7%
b
pat.721
CV = 5,5%
c
pat.721
CV=4,1%
d
pat.721
CV=4,3%

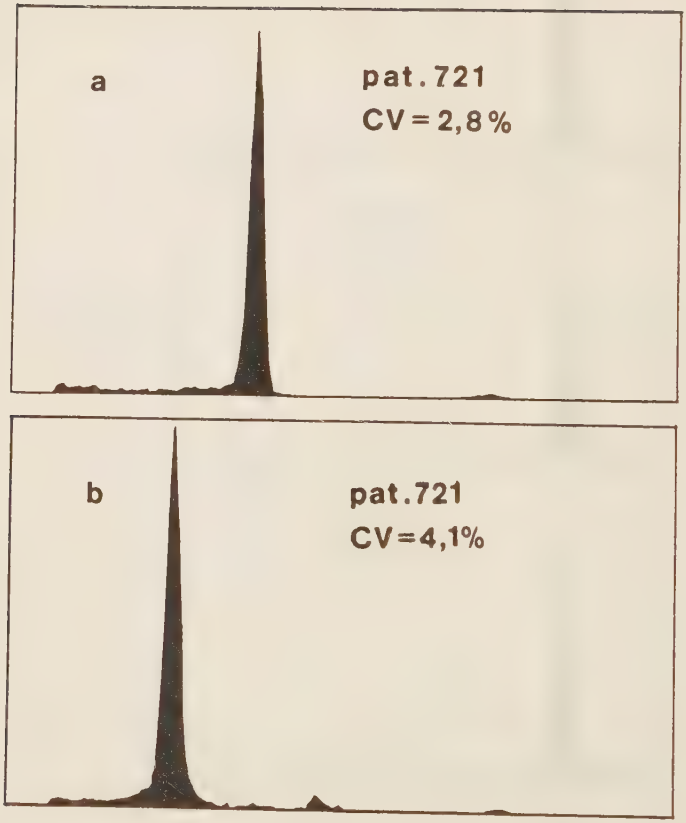


Abb. 4: Histogramme von Spermazellen des Patienten 721 (Krankheitsbild siehe Abb. 3) nach Behandlung mit a) 15 min Papain und b) 30 min Pepsin.

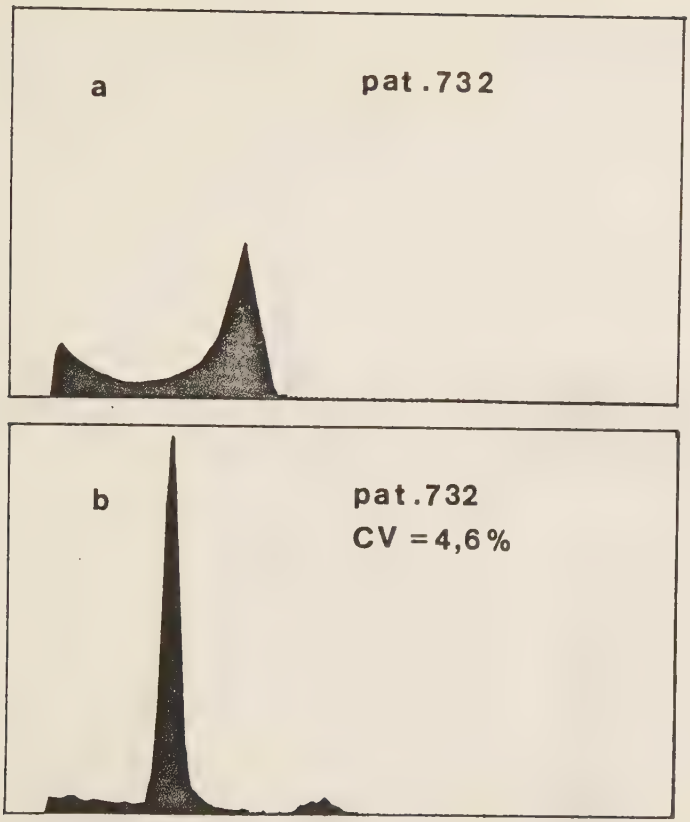


Abb. 5: Histogramme von Spermazellen (Patient 732) bei mittelgradiger Asthenoteratozoospermie nach Behandlung mit a) 15 min Papain und b) 30 min Pepsin.

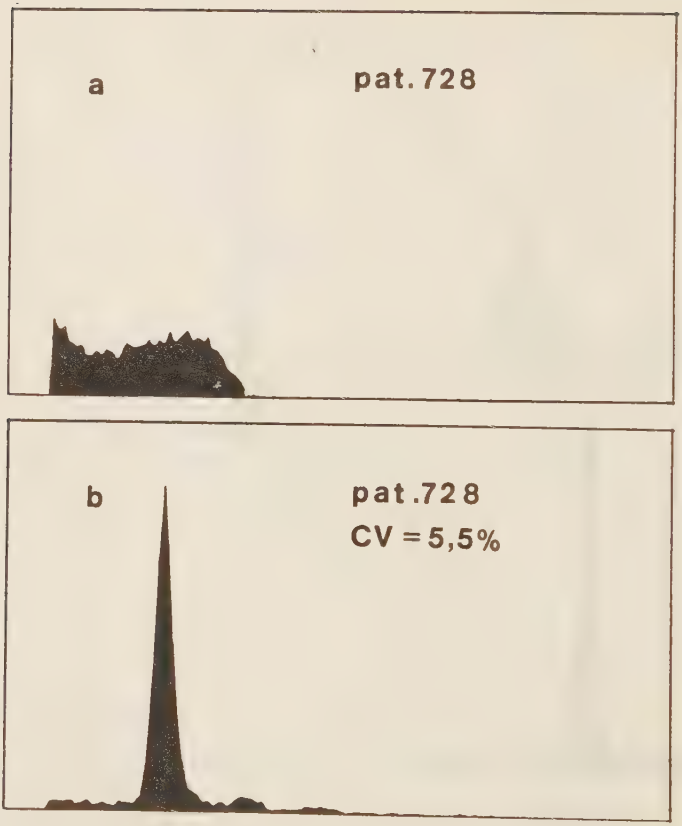


Abb. 6: Histogramme (Patient 728) bei exfoliativer Spermatogenesestörung I. Grades nach Behandlung mit a) 15 min Papain und b) 30 min Pepsin.

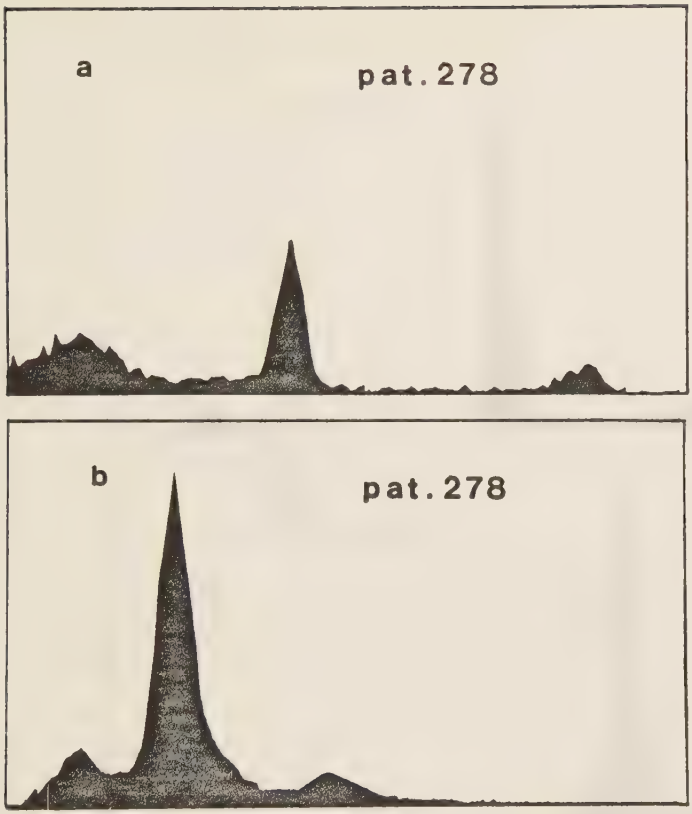


Abb. 7: Histogramme von Spermazellen (Patient 278) bei geringer Spermatozoenbildungsstörung nach Vorbehandlung mit a) 15 min Papain und b) 30 min Pepsin. Spermatozoenzahl 58 Mio / ml; Spermatidenexfoliation: 20 % ; leichte Formstörungen der Spermatozoen. Bei der Ehefrau 2 Frühaborte

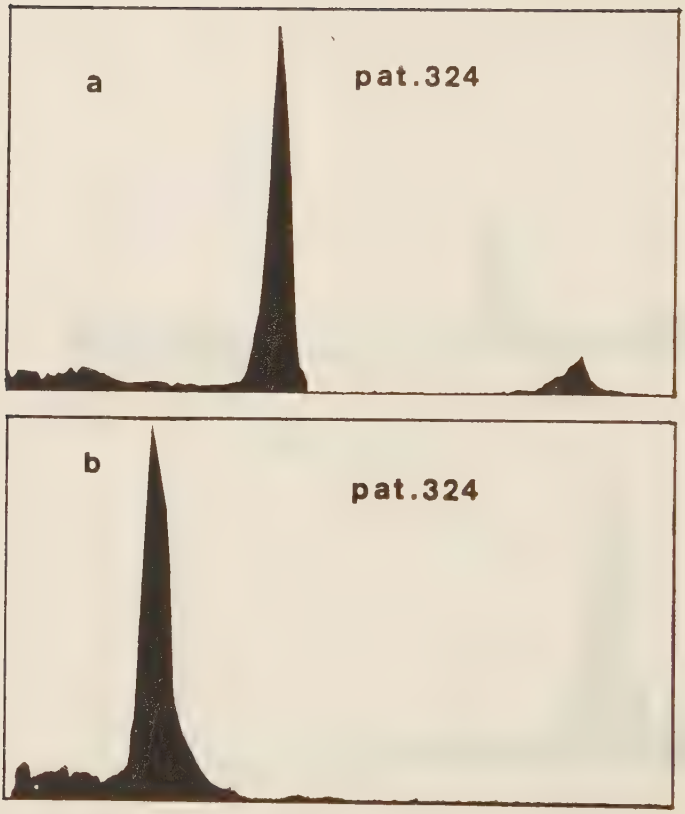


Abb. 8: Histogramme (Patient 324) bei Spermatozoenbildungsstörung und unspezifischer Genitalinfektion nach Vorbehandlung mit a) 15 min Papain und b) 30 min Pepsin. Spermatozoenzahl 17 Mio / ml, dabei hochpathologische Formstörungen

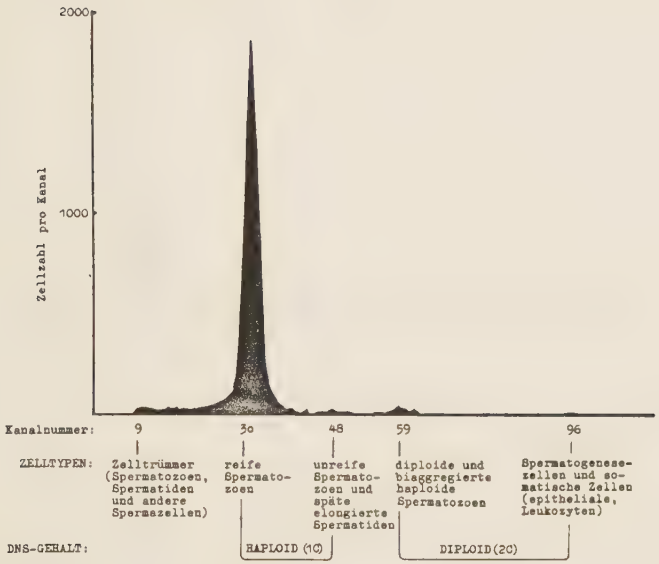


Abb. 9: Histogramm mit verschiedenen Peaks und ihrer Zuordnung zu entsprechenden Zelltypen mit deren DNS-Gehalt (vgl. Abb. 3)

Abb. 10: Histogramme von Patienten mit unterschiedlich schwer ausgeprägten Varikozelen-Orchipathien. In Korrelation zu den Veränderungen der Histogramme steht die Abnahme der Fertilität.

a) Histogramm von Spermazellen des Patienten 735 bei Varikozelen-Orchipathie I. Grades

b) Histogramm von Spermazellen des Patienten 736 bei Varikozelen-Orchipathie II. Grades

c) Histogramm von Spermazellen des Patienten 724 bei Varikozelen-Orchipathie II.-III. Grades.

Die Vorbehandlung des Spermas erfolgte bei allen 3 Patienten mit 30 min Pepsin

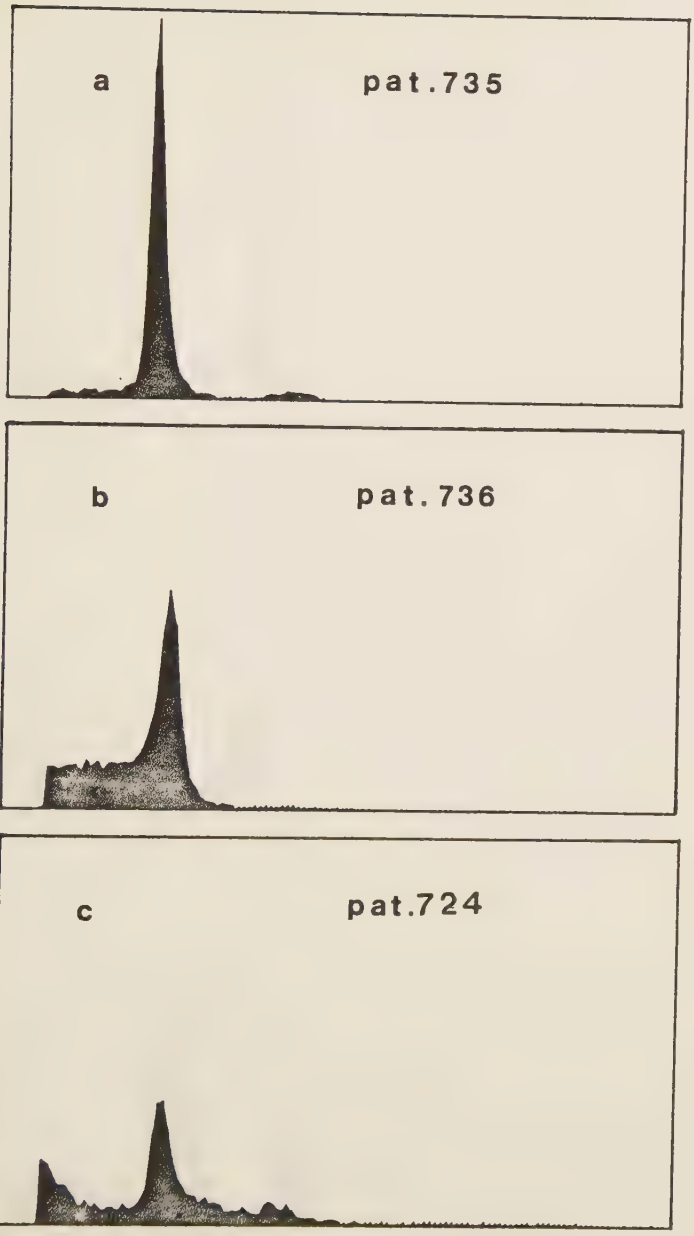
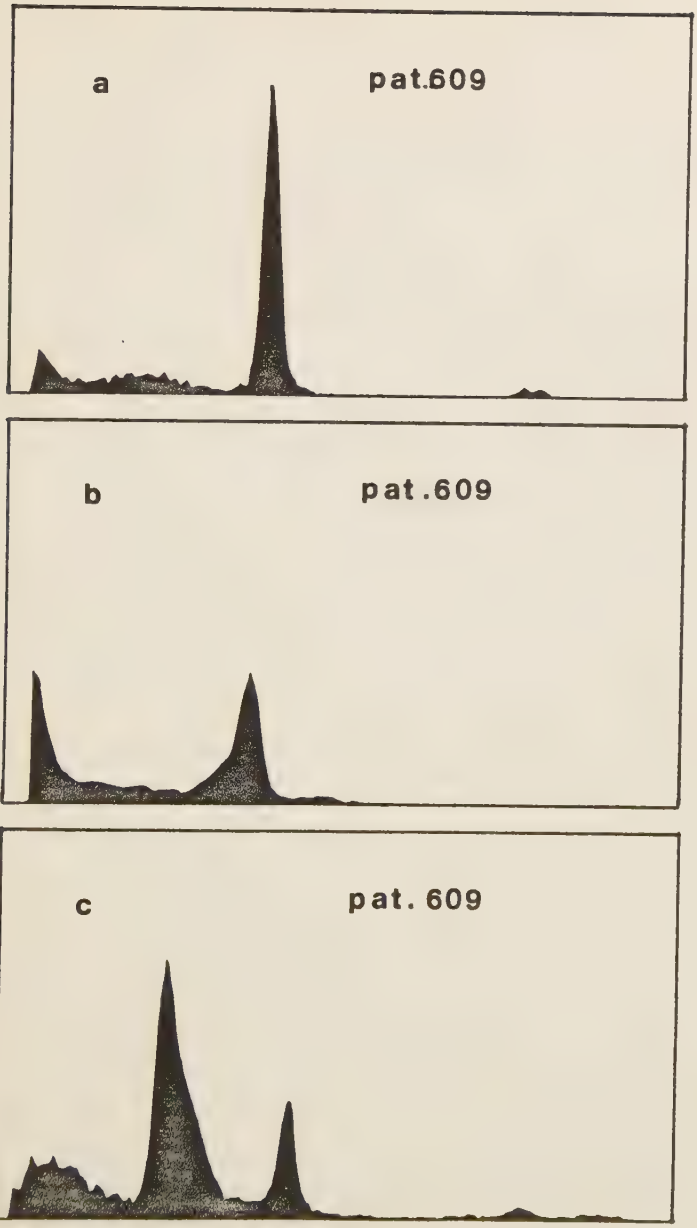

a
pat.735
b
pat.736
c
pat.724

Abb. 11: Histogramme von Spermaproben (Patient 609; vgl. Abb. 2) bei exfoliativer Spermatogenesestörung II. Grades nach jeweils 30-minütiger Pepsinandauung: a) bei Behandlungsbeginn, b) nach antiphlogistischer Behandlung und c) nach niedrig dosierter antioestrogener Medikation


a
pat.609
b
pat.609
c
pat. 609

4. DISKUSSION

Nachdem bereits in Vorversuchen der Zeitpunkt der Spermiengewinnung, die Art und Konzentration des Fixierungsmittels (Essigsäure, Propylalkohol) sowie die Aufbewahrungsdauer des Untersuchungsgutes im Fixans zur Normierung der Materialaufbereitung festgelegt wurden, konnten wir die unterschiedliche Wirksamkeit der enzymatischen Behandlungen (Pepsin pH 1.8, Papain pH 6.4 und pH 5.5) auf die Spermatozoenfluorochromierung in abweichenden Kurvenverläufen im photometrischen Histogramm (HOFMANN et al. 1980, 1981) aufzeigen. Dabei ergab die Papainvorbehandlung (pH 6.4 und pH 5.5) nicht den gewünschten Erfolg, da morphologisch nicht oder nur wenig veränderte Spermatozoen "desintegrierten". Solche Spermatozoen ließen sich nur minimal anfärben und dadurch im Histogramm in Bereichen sehr niedriger DNS-Gehalte, - also ganz links auf der Abzisse, meist zusätzlich mit Schenkelverbreiterung oder Blockbildung - nachweisen. In den Fällen mit "Desintegration" der Spermien führt also die relativ "scharfe" Papainvorbehandlung zu verfälschtem DNS-Gehalt und steht damit im Widerspruch zum Spermiogramm und den klinisch-andrologischen Befunden (vgl.HETTWER et al. 1981). Die vermutlich "mildere" Pepsinvorbehandlung ließ, trotz niedrigerem pH, dieses Phänomen ganz vermissen. Die Pepsinmethode hat darüberhinaus

den Vorteil, daß sie eine genauere Differenzierung, und damit auch eine bessere Beurteilung der Peaks im Histogramm - im Vergleich mit den andrologisch-spermatologischen Befunden - zuläßt.
Auch am menschlichen und tierischen Hodengewebe führt die Pepsinmethode zu ähnlich differenzierten Histogrammen, die - in Übereinstimmung mit denen von ZANTE und Mitarbeitern (1977) bei Nagern abgebildeten - drei Peaks erkennen lassen: Einen 1C-Peak, der den haploiden Spermatozoen entspricht, einen 2C-Peak, der diploide sekundäre Spermatozyten, Spermatogonien, einige Epithel- und Blutzellen repräsentiert, sowie einen 4C-Peak, der vermutlich von primären Spermatozyten, Spermatogonien und von den basalen diploiden Spermatogenesezellen in deren Synthesephasen herrührt. Da es sich bei dem untersuchten Testesgewebe um das eines Patienten mit quantitativer Reduzierung der praemeiotischen / meiotischen Spermiogenesestufen (diploide Spermatogenesezellen) und der adluminalen Spermatogenese in Höhe der Spermatiden (haploide Spermatogenesezellen) mit Exfoliation degenerativ veränderter Spermatiden handelt, kann das dargestellte Histogramm (vgl. Abb. 2) nicht mit denen von ZIMMERMANN (1980) abgebildeten verglichen werden, da es sich bei letzteren um DNS-Histogramme eines gesunden humanen Hodens handelt.
Bei der photometrischen Auswertung dieses patholo-

gischen (Biopsie-) Gewebes stellt sich das Histogramm "desintegriert" dar. Erwartungsgemäß sind reife haploide Spermatozoen in vorliegendem Fall zahlenmäßig extrem reduziert. Das Histogramm weist neben den von ZIMMERMANN (1980) bereits aufgeführten 1C- (in Abb. 2b nur als flacher Untergrund sichtbar) und 2C-Peak einen weiteren Peak im 1C-Bereich auf, der die vermehrten, vorzeitig elongierten Spermatiden repräsentiert. Den ebenfalls vermehrten diploiden Spermatozoen und Zweierformen entspricht der erste - in diesem Fall der höhere - Peak im 2C-Bereich, während der zweite Diploid-Peak (er entspricht dem einzigen Diploid-Peak nach Papainbehandlung) die diploiden Spermatogenesezellen und / oder somatischen Testeszellen (wie Leydig- und Sertolizellen) darstellt. Die Zuordnung dieser zusätzlichen Peaks im 1C- und 2C-Bereich war zum einen durch icp-Messungen von aus dem Nebenhodenkopf entnommenen Spermatozoen, zum anderen durch Vergleich mit reifen, nicht geschädigten Leukozyten (-standards), sowie mit pathologischen, vermehrt unreife Spermatozoen und Spermatiden enthaltenden Spermaproben möglich geworden.

Damit scheint die Pepsinbehandlung für das andrologische Untersuchungsgut in ausreichendem Maße schonend, weil im Gegensatz zur Papainproteolyse alle Zelltypen, auch die unreifen, weitgehend erhalten bleiben.

Insgesamt kann zu den Ergebnissen der Arbeit gesagt werden, daß nach Papainvorbehandlung menschlicher Spermatozoen zur icp-Analyse erhebliche Fehlerquellen auftreten, indem die DNS-Meßergebnisse im Sinne einer "Desintegration" der Spermien verfälscht werden. Demgegenüber ergab sich bei den pepsinbehandelten Spermaproben kein Hinweis auf solche DNS-Abweichung. Peakanzahl im Histogramm und gefundene Zelltypen im Spermiogramm stimmen überein. Die Pepsinmethode ist deshalb für Routinemessungen geeigneter, zumal auch der CV hinreichend niedrig ist, sodaß für den haploiden (1C-) Peak der reifen Spermatozoen eine weitgehend homogene Zellpopulation - auch rechnerisch mit Gauß'scher Verteilung (HARTMANN et al. in Vorbereitung) - ermittelt werden konnte. Die Pepsinbehandlung ist eine hinreichend "milde" Methode, sodaß Zellen mit haploidem DNS-Gehalt, aber verschiedenem Reifungsstadium auch durch zwei Gipfel (1C-Bereich) zur Darstellung gebracht werden. Ähnliches gilt für den diploiden DNS-Bereich (2C-). Dadurch konnte eine Differenzierung der "unreifen" Spermatozoen bzw. der vorzeitig aus dem Sertolizellverband gelösten, späten elongierten Spermatiden, der diploiden Spermatozoen, der Zweierformen und schließlich der diploiden Spermazellen - wenn diese nicht in den Untergrund der Zelltrümmer übergegangen sind - vorgenommen werden. Diese Unterscheidungsmöglichkeiten lassen sich bei Papainvorbehandlung

nicht erreichen.

Abschließend werden Gründe, die für die Anwendung von Pepsin sprechen, noch einmal kurz zusammengefaßt:

1. Unter einigen hundert untersuchten Spermaproben trat das Phänomen der "Desintegration" bei Pepsinvorbehandlung in keinem Fall auf.
2. Der CV war klein, sodaß für den haploiden Peak reifer Spermatozoen eine weitgehend homogene Zellpopulation, auch rechnerisch, ermittelt werden konnte.
3. Die Pepsinbehandlung ist in einem Ausmaß schonend, daß "Nebenpeaks" sowohl im haploiden- wie auch im diploiden DNS-Bereich zur Darstellung gebracht wurden. Diese "Nebenpeaks" kommen nach Papainvorbehandlung nicht in gleichem Maße zur Darstellung.
4. Spermaproben, die mit Pepsin vorbehandelt wurden, ergeben uneingeschränkt reproduzierbare Ergebnisse.

Von diesen Überlegungen ausgehend, könnte die Pepsinmethode als Basis- (Standard-) Methode Anwendung finden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Zur Standardisierung der Aufbereitung von Ejakulaten für die icp-Messung wurden der Zeitpunkt der Spermiengewinnung, die Art und Konzentration des Fixierungsmittels, sowie die Aufbewahrungsdauer des Untersuchungsgutes im Fixans festgelegt. Zunächst wurden Spermaproben nebeneinander mit Papain und Pepsin vorbehandelt. Hierbei stellte sich heraus, daß Spermatozoen, die mit Pepsin vorbehandelt wurden, im Histogramm mit jeweils zwei Peaks im 1C- und 2C-Bereich zur Darstellung kamen. Im 1C-Bereich handelt es sich um haploide Zellen mit unterschiedlichem Reifestadium: reife Spermatozoen, unreife Spermatozoen und späte elongierte Spermatiden. Im 2C-Bereich finden sich: diploide sowie biaggregierte haploide Spermatozoen, andererseits Spermatogenesezellen und somatische Zellen. Mit Papain hingegen ließ sich eine solche differenzierte Darstellung nicht erzielen. Während der Vergleich des Histogramms mit dem zugehörigen Spermiogramm und den klinischen Befunden pepsinvorbehandelter Proben gute Übereinstimmungen erbrachte, war dies bei Proben nach Papainbehandlung - hier wurde wiederholt das Phänomen der "Desintegration" beobachtet - häufig nicht der Fall. Diese Aussagen wurden an verschiedenen klinischen Anwendungsbeispielen überprüft. Hierbei erwies sich die Pepsinmethode als zuverlässig und kann für Routinemessungen in der andrologischen Klinik Anwendung finden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

BARLOGIE, B., ZANTE, J., DREWINKO, B., SCHUMANN, J., BÜCHNER, TH., GÖHDE,W., HART, J.S., JOHNSTON, D.A.: The use of mithramycin in pulse-cytophotometry (PCP). Pulse-Cytophotometry, 1976, 125-136.

DEAN, P.N., PINKEL, D. and MENDESOHN, M.L.: Hydrodynamic orientation of sperm heads for flow cytometry. Biophys. J. 23, 7-13 (1978).

DILLA, M.A. van, TRUJILLO, T.T., MULLANEY, P.F., COULTER, J.R.: Cell microfluorometry: A method for rapid fluorescence measurement. Science 163, 1213-1214 (1969).

DITTRICH, W. und GÖHDE, W.: Impulsfluorometrie bei Einzelzellen in Suspensionen. Z. Naturforsch. 24 b, 360-361 (1969).

FREUNDL, G., DÖRNER, H. und HOFMANN, N. : Korrelation zwischen Spermaparametern im Ejakulat und im Zervixschleim. FDF 8, 168-172 (1980).

FREUNDL, G., HOFMANN, N., OTTO, F.J. and HETTWER, H.: Flow cytometry of human spermatozoa before and after penetration of cervical mucus. In: Advances in Diagnosis and Treatment of Infertility, (Eds. V. Insler, G. Bettendorf), 375-383. Elsevier North-Holland, New York, 1981.

GLEDHILL, B.L., LAKE, S., STEINMETZ, L.L., GRAY, J.W., CRAWFORD, J.R., DEAN, P.N. and VAN DILLA, M.A.: Flow microfluorometric analysis of sperm DNA content: Effect of cell shape on the fluorescence distribution. J. Cell. Physiol. 87, 367-376 (1976).

GÖHDE, W., SCHUMANN, J., ZANTE, J.: The use of DAPI in pulse cytophotometry. Pulse-Cytophotometry III, 229-232 (1978).

GÖHDE, W., SCHUMANN, J., BÜCHNER, I., OTTO, F. and BARLOGIE, B.: Pulse cytophotometry: Application in tumor cell biology and clinical oncology. In: Flow Cytometry and Sorting (Eds. Melamed, M.R., Mullaney, P.F. and Mendelsohn, M.L.), 599-620. John Wiley, New York 1979.

HARTMANN, W., HETTWER, H., HOFMANN, N. und FREUNDL, G.: Die Pepsinvorbehandlung menschlichen Spermas als Standardmethode in der impulszytophotometrischen Analyse. Andrologia 14,

HETTWER, H., HARTMANN, W., OTTO, F.J. und HOFMANN, N.: Die Anwendung der Impulszytophotometrie in der Andrologie. Lab. med. 5, 183-186 (1981).

HOFMANN, N.: Die Beurteilung der Störungen der Spermatogenese und der männlichen Fertilität aufgrund spermatologischer Untersuchungsergebnisse. Z. Hautkr. 54 (1), 5-14 (1979).

HOFMANN, N., OTTO, F.J., FREUNDL, G., HETTWER, H. und OLDIGES, H.: Desintegration von Spermatozoen bei der impulszytophotometrischen Analyse des menschlichen Spermas. Andrologia 12, 534-539 (1980) a.

HOFMANN, N., OTTO, F.J., HETTWER, H. und OLDIGES, H.: Die klinische Anwendung der impulszytophotometrischen Spermaanalyse. FDF 8, 185-187 (1980) b.

KADEN, R. und GROSSGEBAUER, K.: Neues fluoreszenzoptisches Verfahren zur Darstellung menschlicher Spermatozoen. Andrologia 10, 327-330 (1978).

KAMENTSKY, L.A. and MELAMED, M.R.: Rapid multiple mass constituent analysis of biological cells. Ann. New York Acad. Sci. 157, 310-323 (1969).

LEUCHTENBERGER, C., SCHRADER, F., WEIR, D.R. and GENTILE, D.P.: The desoxyribosenucleic acid (DNA) content in spermatozoa of fertile and infertile human males. Chromosoma 6, 61-78 (1953).

MEYHÖFER, W.: Mikrospektrophotometrische Messungen des Nucleinsäuregehaltes von Spermien fertiler und infertiler Männer. Arch. Klin. Exp. Dermatologie 216, 556-614 (1963).

OTTO, F. and OLDIGES, H.: Requirements and procedures for chromosomal DNA measurements for rapid karyotype analysis. Pulse-Cytophotometry III, 393-400 (1978).

OTTO, F.J., HACKER, U., ZANTE, J., SCHUMANN, J. and GÖHDE, W.: Flow cytometry of human spermatozoa. Histochemistry 61, 249-254 (1979) a.

OTTO, F.J., HOFMANN, N., HETTWER, H. und OLDIGES, H.: Die Analyse von Spermaproben mit Hilfe impulszytophotometrischer DNS-Bestimmungen. Andrologia 11, 279-286 (1979) b.

OTTO, F.J., HOFMANN, N., SCHUMANN, J., HACKER, U. und HETTWER, H.: Präparation menschlicher Spermatozoen für die impulszytophotometrische DNS-Messung. FDF 8, 181-184 (1980).

PINKEL, D., DEAN, P., LAKE, S., PETERS, D., MENDELSOHN, M., GRAY, J., VAN DILLA, M. and GLEDHILL, B.:Flow cytometry of mammalian sperm, progress in DNA and morphology measurement. J. Histochem. Cytochem. 27, 353-358 (1979).

RABINOWITZ, Y.: Separation of Lymphocytes, polymorph and nuclear Leucocytes and Monocytes on glas collum, including tissue culture observations. Blood 23, 811-828 (1964).

SEVERIN, E.: Zum Problem der Selektivität von Ethidiumbromid in der Zytofluorometrie zellulärer DNS. In: Impulszytophotometrie (Hrsg. M. Andreeff), 20-30. Springer, Berlin-Heidelberg-New York 1975.

SPRENGER, E., BÖHM, N. und SANDRITTER, W.: Durchfluss-fluoreszenzzytophotometer für ultraschnelle DNS-Messungen an großen Zellpopulationen. Histochemie 26, 238-257 (1971).

STOLLA, R., GROPP, A., LEIDL, W. und HOFMANN, N.: Teratozoospermie aus human- und tiermedizinischer Sicht. Der Hautarzt 29, 518-524 (1978).

ZANTE, J., SCHUMANN, J., BARLOGIE, B., GÖHDE, W. and BÜCHNER, TH.: New preparating and staining procedures for specific and rapid analysis of DNA distributions. Pulse-Cytophotometry (1976), 97-106.

ZANTE, J., SCHUMANN, J., GÖHDE, W. and HACKER, U.: DNA-fluorometry of mammalian sperm. Histochemistry 54, 1-7 (1977).

ZIMMERMANN, A.: Aneuploidie bei malignen Hodentumoren und ihren Lymphknotenmetastasen. Urologe A 19, 391-396 (1980).

L E B E N S L A U F

Am 28. Mai 1951 wurde ich als Sohn von Ludwig Hartmann und seiner Ehefrau Waldtraut Hartmann, geb. Melzer, in Flensburg geboren.
Von 1958 bis 1962 besuchte ich die Volksschule in Flensburg. Von 1962 bis 1970 war ich Schüler des Alten Gymnasiums in Flensburg. 1970 wechselte ich zum Nordseegymnasium in Büsum. Dort bestand ich 1973 die Reifeprüfung.
Im Oktober 1973 verpflichtete ich mich zu einem 2-jährigen Bundeswehrdienst, den ich bei einer Sanitätsstaffel der Luftwaffe in Husum ableistete.

Nach kurzem Studium der Chemie und Physik für die Sekundarstufe II an der Universität Frankfurt erhielt ich zum SS 1976 einen Studienplatz für Medizin an der Universität Düsseldorf. Hier bestand ich die Ärzliche Vorprüfung im März 78, den Ersten (im März 79) und Zweiten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (im März 81). Das WS 81 / 82 ist mein 13. Fachsemester. Zur Zeit absolviere ich das Praktische Jahr in Wuppertal, St. Antonius Kliniken.
Die Doktorarbeit begann ich im WS 79/80 am Anatomischen Institut, Lehrstuhl II und an der andrologischen Abteilung der Hautklinik, Universität Düsseldorf.

Düsseldorf, den 27.1.1982

FOTODRUCK J. MAINZ – Telefon: (02 41) 2 73 05
Neupforte 13, Nähe Markt, 5100 Aachen